

**THIS PAGE IS INSERTED BY OIPE SCANNING
AND IS NOT PART OF THE OFFICIAL RECORD**

Best Available Images

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

BLACK BORDERS

TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT

BLURRY OR ILLEGIBLE TEXT

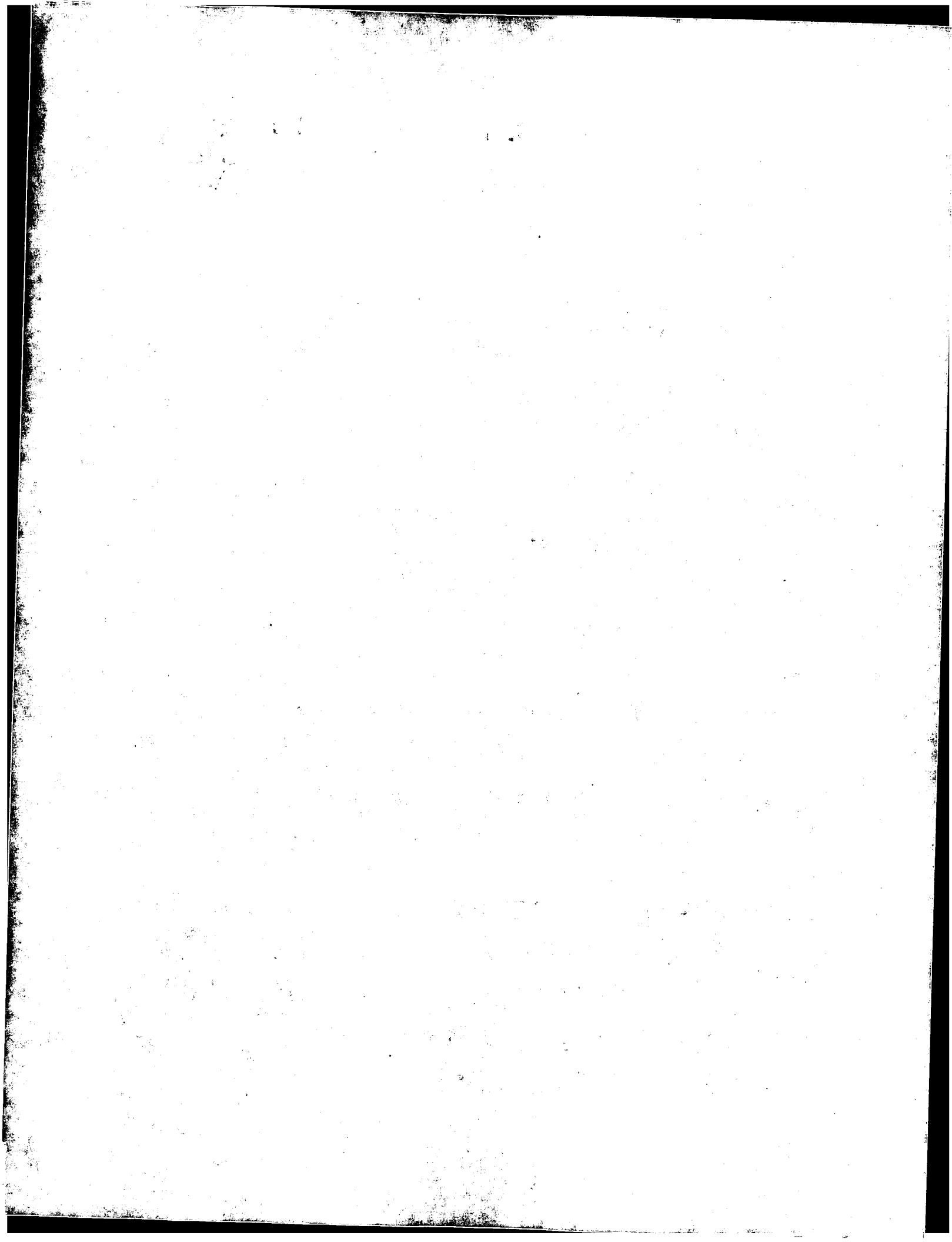
SKEWED/SLANTED IMAGES

COLORED PHOTOS HAVE BEEN RENDERED INTO BLACK AND WHITE

VERY DARK BLACK AND WHITE PHOTOS

UNDECIPHERABLE GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE THE BEST AVAILABLE
COPY. AS RESCANNING *WILL NOT*
CORRECT IMAGES, PLEASE DO NOT
REPORT THE IMAGES TO THE
PROBLEM IMAGE BOX.**



10/089514

PCT/JP00/06783

#2

日本国特許庁

29.09.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 9月29日

REC'D 17 NOV 2000

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第276314号

WIPO

PCT

出願人

Applicant (s):

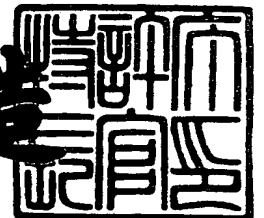
明治製菓株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年11月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3089888

【書類名】 特許願

【整理番号】 PM1541

【提出日】 平成11年 9月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

【氏名】 矢内 耕二

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

【氏名】 岡倉 薫

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

【氏名】 安田 昌平

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

【氏名】 渡辺 学

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

【氏名】 宮本 功一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

【氏名】 御堂 直樹

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

【氏名】 村上 健

【特許出願人】

【識別番号】 000006091

【氏名又は名称】 明治製菓株式会社

【代表者】 北里 一郎

【電話番号】 03-3273-3357

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008305

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 形質転換体及び該形質転換体を利用する2次代謝産物の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ベンゼン環骨格を含み、且つ該ベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基による修飾を受けていない2次代謝産物を生産する生物に、コリスミ酸から p-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子を導入し、ベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基により修飾された2次代謝産物を生産するように改変されたことを特徴とする形質転換体。

【請求項2】 2次代謝産物を生産する生物が、コリスミ酸を経由して生合成されるベンゼン環を少なくとも一つ含む2次代謝産物を生産している生物であることを特徴とする請求項1に記載の形質転換体。

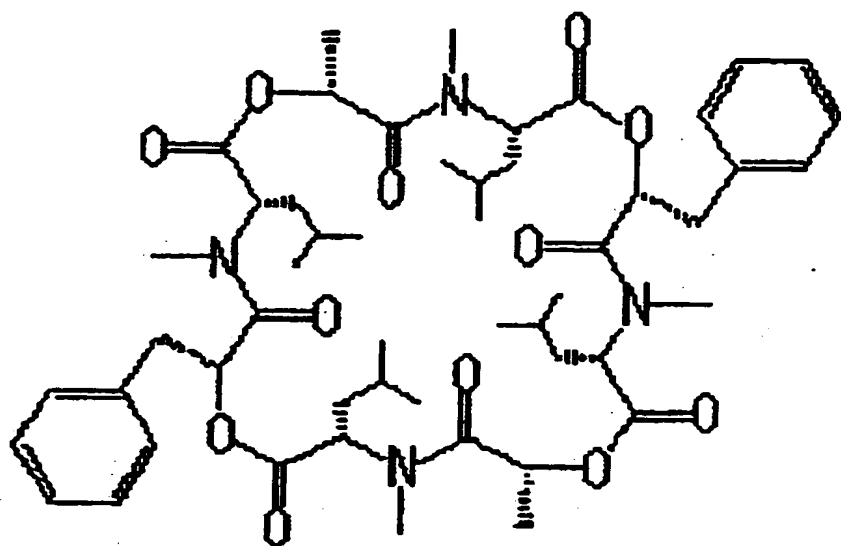
【請求項3】 コリスミ酸を経由して生合成されるベンゼン環が、フェニルピルビン酸、p-ヒドロキシフェニル乳酸、フェニルアラニン、チロシン又はフェニル乳酸であることを特徴とする請求項2に記載の形質転換体。

【請求項4】 2次代謝産物を生産する生物が、ペプチドあるいはデブシペプチドを生産している生物であることを特徴とする請求項1に記載の形質転換体。

【請求項5】 ペプチドあるいはデブシペプチドが、少なくともフェニルアラニン、チロシン、フェニル乳酸の何れか1分子を含むペプチドあるいはデブシペプチドであることを特徴とする請求項4に記載の形質転換体。

【請求項6】 2次代謝産物を生産する生物が、一般式 (I)

【化 1】



(I)

によって示される物質を生産している生物であることを特徴とする請求項1に記載の形質転換体。

【請求項7】 コリスミ酸から p-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与するそれぞれの遺伝子が、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項1～請求項6の何れか一項に記載の形質転換体。

【請求項8】 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼコリスミ酸をコードするそれぞれの遺伝子の内少なくとも一つの遺伝子が、ストレプトマイセス属、ノカルジア属、コリネバクテリウム属に由来の遺伝子であることを特徴とする請求項7に記載の形質転換体。

【請求項9】 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子が、配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項7又は請求項8に記載の形質転換体。

【請求項10】 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子が、配列番号2に示される塩基配列を有する遺伝子であることを特徴とする請求項7

又は請求項8に記載の形質転換体。

【請求項11】 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子が、配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項7又は請求項8に記載の形質転換体。

【請求項12】 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子が、配列番号4に示される塩基配列を有する遺伝子であることを特徴とする請求項7又は請求項8に記載の形質転換体。

【請求項13】 4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、配列番号5に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項7又は請求項8に記載の形質転換体。

【請求項14】 4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、配列番号6に示される塩基配列を有する遺伝子であることを特徴とする請求項7又は請求項8に記載の形質転換体。

【請求項15】 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードするそれぞれの遺伝子が、それぞれ配列番号1、配列番号3及び配列番号5に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項7又は配列番号8に記載の形質転換体。

【請求項16】 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードするそれぞれの遺伝子が、それぞれ配列番号2、配列番号4及び配列番号6に示される塩基配列を有する遺伝子であることを特徴とする請求項7又は請求項8に記載の形質転換体。

【請求項17】 請求項1～請求項16の何れか一項に記載の形質転換体を培養し、ベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基により修飾された2次代謝産物の製造法。

【請求項18】 窒素原子を含む官能基がニトロ基又はアミノ基であることを特徴とする請求項17の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ベンゼン環骨格を含み、且つ該ベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基による修飾を受けていない2次代謝産物を生産する生物に、コリスミ酸からp-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路をコードする遺伝子を導入した形質転換体及び該形質転換体によるベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基で修飾された2次代謝産物の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

生物は生物学的活性を有する多種、多様な2次代謝産物を生産するため、これらを医薬品、動物薬、農業等へ利用しようとする研究が盛んに行われている。しかし、生物由来の2次代謝産物がそのまま実用化されるということは希であり、その生物学的活性を最適化するために様々な官能基で修飾されるのが一般的である。その中で、窒素原子を含む官能基、例えばニトロ基あるいはアミノ基による修飾は最も重要な修飾の一つである。

【0003】

ある物質をニトロ基で修飾するには化学的手法が利用可能である。しかし、化学的手法を用いて、ベンゼン環のパラ位特異的にニトロ基を導入することは難いため、その収率は非常に低い。さらに、ニトロ基で修飾しようとする物質が生物由来の2次代謝産物のように複雑な物質である場合、その中に含まれるベンゼン環のパラ位を特異的にニトロ基で修飾するには一層の困難を伴う。

【0004】

一方、アミノ基を導入する方法には、大別して酵素法と化学法の2つの方法がある。酵素法では、アミノトランスフェラーゼ (EC 2.6.1群) と呼ばれる酵素を使用して行うが、基質となり得る物質が限られており、ベンゼン環に直接アミノ基を転移することができる酵素はこれまでに知られていない。よって、ベンゼン環をアミノ基で修飾しようとする場合には化学法のみが使用可能であった。

【0005】

しかし、化学法の場合、初めにベンゼン環をニトロ基で修飾し、これを還元し

てアミノ基とする、というように二段階の反応が必要なだけではなく、第一段階のニトロ化の反応が必須であることから、その困難さについては前述の通りである。そのため、ベンゼン環のパラ位を特異的にニトロ基あるいはアミノ基で修飾できる方法の開発が切望されていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記観点からなされたものであり、ベンゼン環骨格を含む2次代謝産物で、該2次代謝産物のベンゼン環のパラ位がニトロ基あるいはアミノ基により修飾された2次代謝産物を新たに生産できるように改変された形質転換体及び該形質転換体によるベンゼン環のパラ位がニトロ基あるいはアミノ基により修飾された2次代謝産物の製造法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、ベンゼン環骨格を含む2次代謝産物を生産する生物を、コリスミ酸から

p-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子を含むDNAによって形質転換し、ベンゼン環のパラ位がニトロ基あるいはアミノ基により修飾された2次代謝産物を新たに生産するようになった形質転換体を取得することに成功した。

【0008】

すなわち本発明は、

- (1) ベンゼン環骨格を含み、且つ該ベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基による修飾を受けていない2次代謝産物を生産する生物に、コリスミ酸から

p-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子を導入し、ベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基により修飾された2次代謝産物を生産するように改変されたことを特徴とする形質転換体、
- (2) 2次代謝産物を生産する生物が、コリスミ酸を経由して生合成されるベンゼン環を少なくとも一つ含む2次代謝産物を生産している生物であることを特徴とする(1)に記載の形質転換体、
- (3) コリスミ酸を経由して生合成されるベンゼン環が、フェニルピルビン酸、

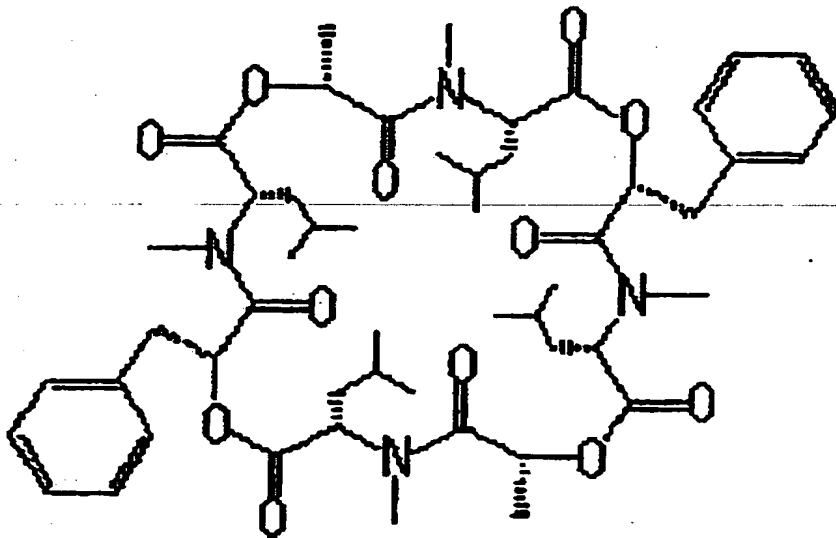
p-ヒドロキシフェニル乳酸、フェニルアラニン、チロシン、フェニル乳酸であることを特徴とする (2) に記載の形質転換体、

(4) 2 次代謝産物を生産する生物が、ペプチドあるいはデブシペプチドを生産している生物であることを特徴とする (1) に記載の形質転換体、

(5) ペプチドあるいはデブシペプチドが、少なくともフェニルアラニン、チロシン、フェニル乳酸の何れか 1 分子を含むペプチドあるいはデブシペプチドであることを特徴とする (4) に記載の形質転換体、

(6) 2 次代謝産物を生産する生物が、一般式 (I)

【化2】



(I)

によって示される物質を生産している生物であることを特徴とする (1) に記載の形質転換体、

(7) コリスミ酸から p-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子が、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードするそれぞれの遺伝子であることを特徴とする (1) ~ (6) の何れか一つに記載の形質転換体、

(8) 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼコ

リスミ酸をコードするそれぞれの遺伝子の内少なくとも一つの遺伝子が、ストレプトマイセス属、ノカルジア属、コリネバクテリウム属に由来の遺伝子であることを特徴とする (7) に記載の形質転換体、

(9) 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子が、配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子であることを特徴とする (7) 又は (8) に記載の形質転換体、

(10) 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子が、配列番号2に示される塩基配列を有する遺伝子であることを特徴とする (7) 又は (8) に記載の形質転換体、

(11) 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子が、配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子であることを特徴とする (7) 又は (8) に記載の形質転換体、

(12) 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子が、配列番号4に示される塩基配列を有する遺伝子であることを特徴とする (7) 又は (8) に記載の形質転換体、

(13) 4-アミノ-4-デオキシブレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、配列番号5に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子であることを特徴とする (7) 又は (8) に記載の形質転換体、

(14) 4-アミノ-4-デオキシブレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、配列番号6に示される塩基配列を有する遺伝子であることを特徴とする (7) 又は (8) に記載の形質転換体、

(15) 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシブレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードするそれぞれの遺伝子が、それぞれ配列番号1、配列番号3及び配列番号5に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子であることを特徴とする (7) 又は (8) に記載の形質転換体、

(16) 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシブレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードするそれぞれの遺伝子が、それぞれ配列番号2、配列番号4及び配列番号6

に示される塩基配列を有する遺伝子であることを特徴とする (7) 又は (8) に記載の形質転換体、

(17) (1) ~ (16) の何れか一つに記載の形質転換体を培養し、ベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基により修飾された 2 次代謝産物の製造法、

(18) 窒素原子を含む官能基がニトロ基又はアミノ基であることを特徴とする (17) の製造法、

に関するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

(1) 形質転換される生物

本発明の形質転換体は、ベンゼン環骨格を含む 2 次代謝産物を生産する生物であれば、これを宿主として、後述する遺伝子を導入することによって取得することができる。好ましい宿主としては、ベンゼン環骨格がコリスミ酸を經由して合成される 2 次代謝産物を生産する生物である。

【0010】

より好ましい宿主としては、ベンゼン環骨格が、フェニルピルビン酸、p-ヒドロキシフェニルピルビン酸、フェニルアラニン、チロシン、フェニル乳酸の何れかの一部として存在する 2 次代謝産物を生産する生物である。

【0011】

さらに好ましい宿主としては、フェニルアラニン、チロシン、フェニル乳酸の何れか 1 分子を含むペプチドあるいはデプシペプチドを 2 次代謝産物として生産する生物である。

【0012】

このような 2 次代謝産物の既知の具体例としては、チオルスタチン D (Thiolstatin D)、ナノケリン (Nannochelin)、フォスフォノフェニルアラニルアルギニン (Phosphonophenylalanylarginine)、I5B1、アフアチニン A (Ahpatinin A)、A-38533、メラノスタチン (Melanostatin)、アルドスタチン (Aldostatin)、N-アセチル-L-フェニルアラニル-L-フェニルアラニノール (N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninol)、ベスタチン (Bestatin)、エスタチン A (Est

atin A)、N-(N-L-アルギニル-D-アロースレオニル)-L-フェニルアラニン {N-(N-L-Arginyl-D-allo-threonyl)-L-phenylalanine}、ストレプトチン (Streptin) P1、WF-10129、クロバミド (Clovamide)、SP-キモスタチン B (SP-Chymostatin B)、アンチpain (Antipain)、ミロリジン K_A (Myroridin K_A)、チロスタチン (Tyrostatin)、デトキシ (Detoxin)、キモスタチン (Chymostatin)、トリデカプチン (Tridecaptin)、アラメサイシン (Alamethicin)、トリコセリン (Trichocerin)、トリコスポリン B (Trichosporin B)、トリコジアニン (Trichorzianine)、サマロスポリン I (Samarosporin I)、スズカシリン A (Suzukacillin A)、トリコロギン (Tricholongin)、ザーバミシン (Zervamicin)、アンチアメビン (Antiamebin)、グラミシジン C (Gramicidin C)、オクラトキシ (Ochratoxin)、FR-900261、クラミドシン (Chlamydocin)、トラポキシ (Trapoxin)、Cyl-1、Cyl-2、アスペルコリン (Aspercolorin)、ロットシン (Lotusine)、リシュウミン (Lyciumin)、アベラニン (Avellanine)、シクロアスペチド (Cycloaspetide)、ボバルジン (Bouvardin)、シクロアマニド A (Cycloamanide A)、シクロアマニド B (Cycloamanide B)、ヘテロフィリン A (Heterophyllin A)、ポリミキシ (Polymyxin)、オクタペプチン (Octapeptin)、Bu-2470A、マイコサチリン (Mycosubtilin)、バシロマイシン D (Bacillmycin D)、イツリン A (Iturin A)、シアノギノシン (Cyanoginosin)、バシトラシン (Bacitracin)、グラミシジン S (Gramicidin S)、アンタマニド (Antamanide)、チロシジン (Tyrocidine)、コチナリン (Cortinarin)、グラチシン (Gratisin)、マイコバシリン (Mycobacillin)、TL 119、ビュウペロライド (Beauverolide)、ネオアンチマイシン (Neoantimycin)、MK3990、ロイアラシン (Leualacin)、A 54556、エノペプチン B (Enopeptin B)、ビュウベリシン (Beauvericin)、キサントスタチン (Xanthostatin)、バリアペプチン (Varipeptin)、バージニアマイシン S_1 (Virginiamycin S_1)、シクロヘプタマイシン (Cycloheptamycin)、WS-9326、フサリア フンギ シクロデプシペプチド (Fusaria fungi cyclodepsipeptide)、FR-900359、ベルラメル (Verlanelin)、ジデムニン (Didemnin)、リポペプチン A (Lipopeptin A)、20561、ネオペプチン (Neopeptin)、オーレオバシジン (Aureobasidin)、シリノゴマイシン (S

yring mycin)、プリパスタチン (Plipastatin)、パーメチン A (Permetin A)、
 BMY-28160、ポリペプチン A (Polypeptin A)、ブレビスチン (Brevistin)、
 ラモプラニン (Ramoplanin)、アンコベニン (Ancovenin)、デュラマイシン (D
 uramycin)、シナマイシン (Cinnamycin)、アクチノイジン (Actinoidin)、PF
 1022等が挙げられる。これらの物質は、Dictionary of Natural Products (Chap
 man & Hall, 1994) に記載されている。

【0013】

(2) コリスミ酸から p-アミノフェニルピルビン酸の生合成経路をコードす
 る遺伝子

コリスミ酸から p-アミノフェニルピルビン酸が生合成されるには、少なくと
 も4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリス
 ミ酸ムターゼ、4-アミノ-4-デオキシブレフェン酸デヒドロゲナーゼの3種の
 酵素活性が必要である (Blanc, V., et al. Mol. Microbiol. 23, 191-202(1997)
)。

【0014】

4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素は、コリスミ酸から p-アミノ安
 息香酸生合成系の一部として生物界に広く存在している。p-アミノ安息香酸は
 コリスミ酸から2段階の反応で生成されるが、この内初めの反応を4-アミノ-4
 -デオキシコリスミ酸合成酵素が触媒し、後の反応を4-アミノ-4-デオキシコ
 リスミ酸リアーゼが触媒する (Green, J. M. and Nichols, B. P., J. Biol. Ch
 em. 266, 12971-12975(1991))。

【0015】

4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子としては、大
 腸菌 (Kaplan, J. B. and Nichols, B. P., J. Mol. Biol. 168, 451-468(1983)
 、Goncharoff, P. and Nichols, B. P., J. Bacteriol. 159, 57-62(1984))、
 枯草菌 (Slock, J. et al., J. Bacteriol. 172, 7211-7226(1990))、クレブシ
 ラ・ニューモニアエ (Klebsiella pneumoniae) (Kaplan, J. B. et al., J. M
 ol. Biol. 183, 327-340(1985)、Gonchar ff, P. and Nichols, B. P., Mol. Bi
 ol. Ev l. 5, 531-548(1988))、ストレプトマイセス・プリスチナスピラリス (

Streptomyces pristinaespiralis) (Blanc, V., et al. Mol. Microbiol. 23, 191-202(1997))、ストレプトマイセス・ベネズエラ (Streptomyces venezuelae) (Brown, M. P. et al., Microbiology 142, 1345-1355(1996))、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) (Edman, J. C. et al., Yeast 9, 669-675(1993)) 由来のものが報告されており、これらを使用することが可能である。勿論、これら以外の4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子を、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素活性を有する生物より常法に従って単離して使用しても良い。

【0016】

一方、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素は、大腸菌、枯草菌、クレブシラ・ニューモニアエ由来のもののように2つのポリペプチドに分かれているものと、一部の放線菌又はサッカロマイセス・セレビスエ由来のもののように一つのポリペプチドから成るものの二つに大別することがある。本発明では、複数の遺伝子を宿主に導入する必要があることから、一つのポリペプチドから成る4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子を利用する方が好ましく、より好ましい遺伝子としては、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子であり、さらに好ましい遺伝子としては、配列表の配列番号2に示される塩基配列を含む遺伝子である。

【0017】

4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードするそれぞれの遺伝子は、p-アミノフェニルピルビン酸を生合成できる生物から得ることができる。より具体的には、プリスチナマイシン I (pristinamycin I) を生産するストレプトマイセス・プリスチナスピラリス (Streptomyces pristinaespiralis)、ベルナマイシン B (vernamicin B) を生産するストレプトマイセス・ロイデンス (Streptomyces loidensis)、コリネシン (corynesin) を生産するノカルジア・パラフィニカ (Nocardia paraffinnica) 及びコリネバクテリウム・ハイドロカルボクラスタス (Corynebacterium hydrocarboclastus)、クロラムフェニコール (chloramphenicol) を生産するストレプトマイセス・ベネズエラ (Streptomyces venezuelae) 等が挙げ

られる。この内、ストレプトマイセス・プリスチナスピラリス (*Streptomyces pristinaespiralis*) からは、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードすると推定されるそれぞれの遺伝子が既に単離され、その塩基配列が明らかにされており (V. Blanc et al., Mol. Microbiol., 23, 191-202(1997))、本発明に利用可能である。

【0018】

一方、コリスミ酸ムターゼ及びプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードするそれぞれの遺伝子は、細菌、酵母、植物等から既に多数単離されており、これらを元にして蛋白質工学的的手法又は進化工学的的手法を利用し、適切なアミノ酸を置換、欠質あるいは付加することによって4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ活性及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性を持つように改変することは可能であり、改変された遺伝子を本発明に利用することは勿論可能である。本発明における好ましい4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は配列表の配列番号3及び配列番号5に示されるアミノ酸配列をそれぞれコードする遺伝子であり、より好ましい遺伝子は、配列表の配列番号4及び配列番号6にそれぞれ示される塩基配列を含む遺伝子である。

【0019】

(3) 形質転換体

本発明の形質転換体は、上記遺伝子を、上記宿主細胞内で複製可能でかつ同遺伝子が発現可能な状態で含むDNA分子、特に発現ベクター、の形態として宿主細胞の形質転換を行うことによって取得することができる。

【0020】

本発明においては複数の遺伝子を宿主細胞に導入することになるが、各遺伝子は同一又は別々のDNA分子に含まれていても良い。さらに、宿主細胞が細菌である場合には、各遺伝子をポリシストロン性mRNAとして発現させるように設計し、一つのDNA分子とすることも可能である。

【0021】

本発明において利用される発現ベクターは、使用する宿主細胞の種類を勘案しながら、ウイルス、プラスミド、コスミドベクター等から適宜選択することができる。例えば、宿主細胞が大腸菌の場合は λ ファージ系のバクテリオファージ、pBR、pUC系のプラスミド、枯草菌の場合はpUB系のプラスミド、酵母の場合はYEp、YRp、YCp、YIp系のプラスミドベクターが挙げられる。

【0022】

また、使用されるプラスミドベクターの内、少なくとも一つは、形質転換体を選抜するための選択マーカーを含むのが好ましく、選択マーカーとしては薬剤耐性遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を使用することができる。その好ましい具体例としては、使用する宿主が細菌の場合は、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等であり、酵母の場合はトリプトファン生合成遺伝子 (TRP1)、ウラシル生合成遺伝子 (URA3)、ロイシン生合成遺伝子 (LEU2) 等であり、カビの場合はハイグロマイシン耐性遺伝子、ピアラホス耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子、オーレオバシジン耐性遺伝子等であり、植物の場合にはカナマイシン耐性遺伝子、ピアラホス耐性遺伝子等が挙げられる。

【0023】

さらに、本発明において利用される発現ベクターとしてのDNA分子は、各遺伝子の発現に必要なDNA配列、例えばプロモーター、転写開始信号、リボソーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結信号等の転写調節信号、翻訳調節信号等を有しているのが好ましい。

【0024】

プロモーターとしては、例えば大腸菌においてはラクトースオペロン、トリプトファンオペロン等のプロモーター、酵母ではアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子、酸性フォスファターゼ遺伝子、ガラクトース資化性遺伝子、グリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子等のプロモーター、カビでは α -アミラーゼ遺伝子、グルコアミラーゼ遺伝子、セロビオハイドロラーゼ遺伝子、グリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、abp1遺伝子等のプロモーター、植物ではCaMV 35SRNAプロモーター、CaMV 19SRNAプロモーター、ノパリン合成酵素

遺伝子プロモーター等が挙げられる。

【0025】

形質転換には、カルシウムイオン法、リチウムイオン法、エレクトロポレーション法、PEG法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法等のような常法を用いて、供試する宿主細胞に応じて用いれば良い。

【0026】

本発明においては、ベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基により修飾された2次代謝産物を生産する能力を有する前記(1)～(16)に示した形質転換体が、培地に培養される。本発明の形質転換体の培養も常法に従って、培地、培養条件等を適宜選択することにより行うことができる。

【0027】

培地としては、本発明の形質転換体が同化し得る炭素源、資化し得る窒素源、無機塩類、各種ビタミン、グルタミン酸又はアスパラギン等の各種アミノ酸、ヌクレオチド等の微量栄養素、抗生物質等の選抜薬剤を添加することもできる。また、本発明の形質転換体の発育を助け、目的とする2次代謝産物の生産を促進するような有機物及び無機物を適当に添加することができる。さらに、必要に応じてその他の栄養物をほどよく含有する合成培地または天然培地を使用することができる。

【0028】

培地に使用される炭素源及び窒素源としては、本発明の形質転換体の利用可能なものならば何れの種類でも良い。同化し得る炭素源としては例えばショ糖、ブドウ糖、澱粉、グリセリン、グルコース、シュクロース、グリセロール、フラクトース、マルトース、マンニトール、キシロース、ガラクトース、リボース、デキストリン、動・植物油等又はその加水分解物等の種々の炭水化物が利用できる。その濃度は通常、培地に対して0.1～5%が好ましい。

【0029】

資化し得る窒素源としては例えばペプトン、肉エキス、コーン・ステイブ・リカー、脱脂大豆粉等の動植物体成分又は浸出エキス類、コハク酸アンモニウム塩類、酒石酸アンモニウム等の有機酸アンモニウム類、尿素その他各種無機酸若

しくは有機酸の含窒素化合物も使用可能である。

【0030】

また、無機塩類としては例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸及びその他のイオンを生成することのできるものが適宜添加使用される。

【0031】

勿論、その他の成分として例えば酵母等の微生物の菌体又は浸出液及び浸出エキス等、また植物体の細末を含む培地であっても本発明の形質転換体の生育及び目的とする2次代謝産物の生産蓄積を妨げない限り何れをも適宜に使用し得る。

また、栄養要求性を示す変異株を培養する場合には、その栄養要求性を満足させ得る物質を培地に加えるが、この種の栄養素は、天然物を含む培地を使用する場合は、特に添加を必要としない場合がある。

【0032】

培地のpHは、例えばpH 6～pH 8程度である。培養法としては、好氣的条件での振とう培養法、通気攪拌培養法又は深部好気培養法により行うことができる。培養に適当な温度は、15℃～40℃であるが、多くの場合26℃～37℃付近で生育する。目的とする2次代謝産物の生産は、培地及び培養条件、又は使用した宿主により異なるが、何れの培養法においても通常2日～25日間でその蓄積が最高に達する。目的とする2次代謝産物の量が最高になった時に培養を停止し、培養物から目的物質を単離、精製する。

【0033】

これらの培地組成、培地の液性、培養温度、攪拌速度、通気量等の培養条件は使用する形質転換体及び外部の条件等に応じて好ましい結果が得られるように適宜調節、選択されることはいうまでもない。液体培養において、発泡があるときは、シリコン油、植物油、鉱物油、界面活性剤等の消泡剤を適宜使用できる。このようにして得られた培養物に蓄積される目的とする2次代謝産物は、本発明の形質転換体内及び培養濾液中に含有されるので、培養物を遠心分離して培養濾液と形質転換体とに分離し、各々から目的とする2次代謝産物を採取することが可能である。

【0034】

培養濾液から目的とする2次代謝産物を採取するには、常法により、培養物から目的とする2次代謝産物を採取するのに用いられる手段を、単独若しくは任意の順序に組合せ又は反復して用いられる。すなわち、例えば抽出濾過、遠心分離、透析、濃縮、乾燥、凍結、吸着、脱着、各種溶媒に対する溶解度の差を利用する例えば沈殿、結晶化、再結晶、転溶、向流分配法、クロマトグラフィー等の手段が用いられる。

【0035】

また、本発明の形質転換体内の培養物から、目的とする2次代謝産物を取得することができる。常法により、例えば培養物から抽出（磨砕処理、加圧破碎等）、回収（ろ過、遠心分離等）及び精製（塩析法、溶媒沈殿法等）等の手法が用いられる。

【0036】

得られた粗物質は、常法により、例えばシリカゲル、アルミナ等の担体を用いるカラムクロマトグラフィー又はODS担体を用いる逆相クロマトグラフィーにより精製することができる。以上のような方法により、又はこれらを適宜組合せることにより、本発明の形質転換体の培養物から目的とする純粋な2次代謝産物が得られる。

【0037】

【実施例】

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0038】

実施例1 ストレプトマイセス・ベネズエラ (Streptomyces venezuelae) からの4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ及び4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをそれぞれコードする遺伝子の単離

【0039】

(1) プローブ用DNA断片の取得

50 ml分の液体培地 (2 %可溶性デンプン、1 %ポリペプトン、0.3 %肉エキス、0.05 %リン酸二水素カリウム、pH 7.0) を250 ml容の三角フラスコに作製した。この培地に、ストレプトマイセス・ベネズエラ (*Streptomyces venezuelae*) ISP 5230株及び140-5株をそれぞれ植菌し、28℃、24時間培養した。培養終了後、培養液から遠心により菌体を集め、これらの菌体よりGenetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual (D. A. Hopwood et al., The John Innes Foundation, 1985) に記載の方法で染色体DNAを調製した。

【0040】

次に、上記ストレプトマイセス・ベネズエラ (*Streptomyces venezuelae*) ISP 5230株の染色体DNAを鋳型とし、配列表の配列番号7及び配列番号8に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いPCRを行った。PCRは、TaKaRa LA PCRTM kit Ver. 2.1 (宝酒造社製) を使用し、GeneAmp PCR System 2400 (パーキン・エルマー社製) を用いて行った。反応液は、染色体DNAを1 μ l (0.62 μ g相当量)、キットに添付の10倍濃度反応用緩衝液を5 μ l、2.5mM dNTP溶液を8 μ l、100 pmol/ μ lの濃度に調整した上記プライマーを各0.5 μ lずつ、ジメチルスルホキシド (和光純薬社製) を5 μ l、TaKaRa LA-Taq (2.5U) を0.5 μ l、滅菌水を29.5 μ l加えて50 μ lとした。反応は、94℃、10分間の前処理後、94℃で1分間、50℃で1分間、72℃で3分間のインキュベーションを25サイクル行った。反応終了後、反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した結果、約2 kbpのDNA断片が特異的に増幅されている事が確認された。そこで、残りの反応液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) で抽出し、エタノール沈殿を行った。沈殿を滅菌水に再溶解し、60 μ lのスケールで制限酵素Bam^{HI}で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約2 kbpのバンドを常法に従って切り出してDNA断片を回収した。

【0041】

このDNA断片をプラスミドpTrcHis B (インビトロジェン社製) のBam^{HI}部位にクローニングした。得られたプラスミドの挿入断片の制限酵素地図はブラウンら (M. P. Brown, et al, Microbiology, 142, 1345-1355 (1996)) によって示されているpabAB遺伝子 (U21728) のものと一致したことから、pabAB遺伝子がクローニ

ングされたと判断し、このプラスミドをpTH-PABと命名した。後述する染色体DNAライブラリーのスクリーニングには、プラスミドpTH-PABから制限酵素BamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動で分離、回収して得られる挿入断片をプローブとして用いた。

【0042】

(2) 染色体DNAライブラリーのスクリーニングと遺伝子の単離

ストレプトマイセス・ベネズエラ (*Streptomyces venezuelae*) 140-5株の染色体DNA約10 μ gを制限酵素Sau3AIで部分消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、10 kbp~20 kbpのDNA断片を分離、回収した。

【0043】

こうして回収した10 kbp~20 kbpのDNA断片約0.5 μ gと、予め制限酵素BamHI及びXhoIで二重消化しておいたλ DASH II 1 μ gをT4 DNAリガーゼで連結し、Gigapack IIIパッケージングエキストラクト (ストラタジーン社製) を用いてin vitroパッケージし、染色体DNAライブラリーを作成した。これを大腸菌XLI-Blue MRAに感染させる事によりプラークを形成させた。

【0044】

(1) で単離した約2 kbpのDNA断片をプローブとして用い、ECLダイレクトDNA/RNAラベリング・検出システム (アマシャムファルマシアバイオテック社製) を使用してプラークハイブリダイゼーションを行い、約24000個のプラークをスクリーニングした。取得された陽性クローンの内10個について2次スクリーニングを行い、陽性クローンを純化した後、ファージDNAを調製した。

【0045】

これらファージDNAを制限酵素BamHIで消化し、サザン解析を行った結果、プローブは約1.8 kbp及び約3.4 kbpの2種類のDNA断片にハイブリダイズする事が明らかとなった。また、ファージDNAの制限酵素地図の解析から、これら2種類のDNA断片は染色体DNA上で隣り合う断片である事が明らかとなった。

【0046】

そこで、これら2種類のDNA断片の全塩基配列を蛍光DNAシーケンサーABI PRISM 377 (パーキン・エルマー社製) を用いて決定した。そして、オープンリーデ

イングフレーム (ORF) を検索した結果、図1に示すようにORF I ~ IVのORFを見出す事ができた。各ORFから推定されるアミノ酸配列について、データベースを利用して既知のアミノ酸配列との相同性を検索した結果、ORF Iはp-アミノ安息香酸合成酵素と、ORF IIはプレフェン酸デヒドロゲナーゼと、ORF IIIはコリスミ酸ムターゼと相同性を示すことが明らかとなった。そこで、ORF I、II及びIIIの遺伝子をそれぞれ、

papC

及び

papB

と命名した。

papA

がコードするアミノ酸配列及び塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号1及び配列番号2に、

papB

がコードするアミノ酸配列及び塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号3及び配列番号4に、

papC

がコードするアミノ酸配列及び塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号5及び配列番号6に示した。

【0047】

実施例2 大腸菌における papA 遺伝子の発現

papA

遺伝子の翻訳領域を取得するため、実施例1に示した陽性クローン由来のファージDNAを鋳型とし、配列表の配列番号9及び配列番号10に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った。PCRは、DNAポリメラーゼとしてKOD Dash (東洋紡績社製) を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (パーキン・エルマー社製) を用いて行った。反応液は、ファージDNAを1 μ l (1 μ g相当量)、酵素に添付の10倍濃度反応用緩衝液を5 μ l、2 mM dNTP溶液を5 μ l、100 pmol/ μ lの濃度に調整した上記プライマーを各1 μ lずつ、ジメチルスルホキシド (和光純薬社製) を5 μ l、KOD Dashを1 μ l、滅菌水を31 μ l加えて50 μ lとした。反応は、94℃、5分間の前処理後、94℃で30秒間、50℃で2秒間、72℃で30秒間のインキュベーションを15サイクル行った。得られた反応液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25：24：1) で抽出し、エタノール沈殿を行った。沈殿を滅菌水に再溶解し、DNAブラテイングキット (宝酒造社製) を用いてDNA末端を平滑化した。さらに、T4 DNAキナーゼ (和光純薬社製) を利用して5' 末端をリン酸化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、約2 kbpのDNA断片を切り出し、回収した後、プラスミドpUC118のSmaI部位にクローニングし、プラスミドpUC118-papAを得た。

【0048】

尚、プラスミドpUC118-papAで形質転換された大腸菌（大腸菌JM109）は、FERM P-17569の受託番号のもと工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0049】

pUC118-papAの挿入断片について、蛍光DNAシーケンサーABI PRISM 310 Genetic Analyzer（パーキン・エルマー社製）を用いて塩基配列を決定した結果、配列表の配列番号2に記載の塩基配列の2043番目のシトシンがアデニンに置換されていることが明らかとなった。これは、PCRによるDNA断片の増幅時のエラーと推定されたが、コードされるアミノ酸配列には変化が無いことから、pUC118-papAの挿入断片を以降の実験に用いることにした。

【0050】

pUC118-papAを大腸菌JM110へ導入し、取得された形質転換体より常法によりプラスミドを調製した。これを制限酵素BclIで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、約2 kbpのBclI DNA断片を分離、回収した。

【0051】

一方、プラスミドpTrc99A（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を制限酵素NcoIで消化し、Mung Bean Nuclease（和光純薬社製）を用いてDNA末端を平滑化した。これを更に制限酵素SmaIで消化した後、T4 DNAリガーゼで自己連結してプラスミドpTrc101を得た。

【0052】

pTrc101を制限酵素BamHIで消化し、アルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）処理を施した後、上述の2 kbpのBclI DNA断片と連結した。pTrc101に含まれるプロモーターに対し、papA遺伝子が正方向に挿入されたプラスミドを選択し、pTrc-papAと命名した。これまでのプラスミドの構築工程について図2に示した。

【0053】

pTrc-papAを保持する大腸菌JM109株を、100 μ g/mlのアンピシリンを含むLB液体培地（1 %バクトトリプトン、0.5 %酵母エキス、0.5 %塩化ナトリウム）中、37℃で一晩培養した。得られた培養液1 mlを100 mlの同培地にシードし、30℃、4時間培養した後、1 mlの100 mMイソプロピルチオガラクトシド（IPTG）を添

加し、さらに30℃で3時間培養した。培養後、培養液から遠心により菌体を集め、4 mlの細胞破碎用緩衝液(50 mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、5 mM EDTA、10 % グリセロール)に懸濁した後、超音波処理により細胞を破碎した。破碎後、遠心により上清を得、これを細胞抽出液とした。また、プラスミドpTrc101を保持する大腸菌JM109株についても同様の処理を行い、細胞抽出液を調製した。

【0054】

この様にして調製した細胞抽出液を用いて酵素活性を測定した。すなわち、細胞抽出液を100 μ l、蒸留水を400 μ l、基質溶液(10 mM コリスミ酸バリウム塩(シグマ社製)、10 mM グルタミン(和光純薬社製)、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM MOPS(和光純薬社製)、pH 7.5)を500 μ l混合し、30℃、2時間反応させた。反応終了後、反応液の一部を全自動アミノ酸分析機JLC-500/V(日本電子株式会社製)を用いて分析した。

【0055】

その結果、図3に示すように、pTrc-papAを保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合には、チア-ユ ピー テンら(Chia-Yu P. Teng, et al, J. Am. Chem. Soc., 107, 5008-5009 (1985))の方法に従って合成した4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸標品と同一の保持時間の位置にピークが検出された。一方、煮沸処理した細胞抽出液や、pTrc101を保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合にはその位置にピークは検出されなかった。以上の結果から遺伝子は4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードしていることが示された。

【0056】

実施例3 大腸菌における遺伝子の発現

papB

遺伝子の翻訳領域を取得するため、実施例1に示した陽性クローン由来のファージDNAを鋳型とし、配列表の配列番号11及び配列番号12に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った。PCRは、DNAポリメラーゼとしてKOD Dash(東洋紡績社製)を使用し、GeneAmp PCR System 9700(パーキン・エルマー社製)を用いて行った。反応液は、ファージDNAを1 μ l(1 μ g相当量)、酵素に添付の10倍濃度反应用緩衝液を5 μ l、2 mM dNTP溶液を5 μ l、100 pmol/ μ lの

濃度に調整した上記プライマーを各 $1\mu\text{l}$ ずつ、ジメチルスルホキシド（和光純薬社製）を $5\mu\text{l}$ 、KOD Dashを $1\mu\text{l}$ 、滅菌水を $31\mu\text{l}$ 加えて $50\mu\text{l}$ とした。反応は、 94°C 、5分間の前処理後、 94°C で30秒間、 50°C で2秒間、 72°C で30秒間のインキュベーションを15サイクル行った。得られた反応液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）で抽出し、エタノール沈殿を行った。沈殿を滅菌水に再溶解し、制限酵素BamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約0.3 kbpのバンドを定法に従って切り出してDNA断片を回収した。

【0057】

pTrc101を制限酵素BamHIで消化し、アルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）処理を施した後、上述の0.3 kbpのBamHI DNA断片とT4 DNAリガーゼで連結した。pTrc101に含まれるプロモーターに対し、papB遺伝子が正方向に挿入されたプラスミドを選択し、pTrc-papBと命名した（図4）。pTrc-papBの挿入断片について、蛍光DNAシーケンサーABI PRISM 310 Genetic Analyzer（パーキン・エルマー社製）を用いて塩基配列を決定し、配列表の配列番号4に記載の塩基配列と一致していることを確認した。

【0058】

尚、プラスミドpTrc-papBで形質転換された大腸菌（大腸菌JM109）は、FERM P-17570の受託番号のもと工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0059】

pTrc-papBを保持する大腸菌JM109株を、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLB液体培地（1 %バクトトリプトン、0.5 %酵母エキス、0.5 %塩化ナトリウム）中、 37°C で一晩培養した。得られた培養液 1 ml を 100 ml の同培地にシードし、 37°C 、2時間培養した後、 1 ml の 100 mM イソプロピルチオガラクトシド（IPTG）を添加し、さらに 37°C で5時間培養した。培養後、培養液から遠心により菌体を集め、 4 ml の細胞破碎用緩衝液（ 50 mM トリスー塩酸（ $\text{pH } 8.0$ ）、 5 mM EDTA、10 %グリセロール）に懸濁した後、超音波処理により細胞を破碎した。破碎後、遠心により上清を得、これを細胞抽出液とした。また、プラスミドpTrc101を保持する大腸菌JM109株についても同様の処理を行い、細胞抽出液を調製した。

【0060】

この様にして調製した細胞抽出液を用いて酵素活性を測定した。すなわち、細胞抽出液を $50\mu\text{l}$ 、蒸留水を $200\mu\text{l}$ 、基質溶液 (2 mg/ml 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸、 10 mM 塩化マグネシウム、 100 mM MOPS (和光純薬社製)、 $\text{pH } 7.5$) を $250\mu\text{l}$ 混合し、 30°C 、1時間反応させた。反応終了後、反応液の一部を全自動アミノ酸分析機JLC-500/V (日本電子株式会社製) を用いて分析した。

【0061】

その結果、図5に示すように、pTrc-papBを保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合には、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸のピークが減少し、4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸のピークが新たに検出された。また、5分間煮沸処理を施した細胞抽出液を用いた場合でも同様の結果が得られた。

【0062】

一方、pTrc101を保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合には、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸のピークに変化が無く、4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸のピークも検出されなかった。以上の結果からpapB遺伝子が4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードしていること及びpapB遺伝子にコードされる4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼは5分間の煮沸処理でも失活しないだけの耐熱性を有していることが示された。

【0063】

実施例4 大腸菌におけるpapC遺伝子の発現

papC遺伝子の翻訳領域を取得するため、実施例1に示した陽性クローン由来のファージDNAを鋳型とし、配列表の配列番号13及び配列番号14に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った。PCRは、DNAポリメラーゼとしてKOD Dash (東洋紡績社製) を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (パーキン・エルマー社製) を用いて行った。反応液は、ファージDNAを $1\mu\text{l}$ ($1\mu\text{g}$ 相当量)、酵素に添付の10倍濃度反応用緩衝液を $5\mu\text{l}$ 、 2 mM dNTP溶液を $5\mu\text{l}$ 、 $100\text{ pmol}/\mu\text{l}$ の濃度に調整した上記プライマーを各 $1\mu\text{l}$ ずつ、ジメチルスルホキシド (和光純薬社製) を $5\mu\text{l}$ 、KOD Dashを $1\mu\text{l}$ 、滅菌水を $31\mu\text{l}$ 加えて $50\mu\text{l}$ とした。反応は、 94°C 、5分間の前処理後、 94°C で30秒間、 50°C で2秒間、 72°C で30秒間のインキュベーションを15サイクル行った。得られた反応液をフェノール：クロロホルム：イ

ソアミルアルコール (25 : 24 : 1) で抽出し、エタノール沈殿を行った。沈殿を滅菌水に再溶解し、制限酵素 BamHI で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約 1 kbp のバンドを常法に従って切り出して DNA 断片を回収した。

【0064】

プラスミド pET-11c (ストラタジーン社製) を制限酵素 BamHI で消化し、アルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) 処理を施した後、上述の 1 kbp の BamHI DNA 断片と T4 DNA リガーゼで連結した。pET-11c に含まれるプロモーターに対し、papC 遺伝子が正方向に挿入されたプラスミドを選択し、pET-papC と命名した。

【0065】

尚、プラスミド pET-papC で形質転換された大腸菌 (大腸菌 JM109) は、FERM P-17571 の受託番号のもと工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0066】

pET-papC の挿入断片について、蛍光 DNA シークエンサー ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (パーキン・エルマー社製) を用いて塩基配列を決定し、配列表の配列番号 6 に記載の塩基配列と一致していることを確認した。

【0067】

一方、pET-papC を用いて papC 遺伝子を発現させた場合、ベクター由来の 14 アミノ酸から成るペプチドが papC 遺伝子産物の N 末端側に付加されるため、papC 遺伝子産物の性質を正確に評価できないことが予想された。そこで、pET-papC を制限酵素 NdeI で消化した後、T4 DNA リガーゼで自己連結してプラスミド pET-papC1 を得た。pET-papC1 を用いることで、融合蛋白質としてではなく、papC 遺伝子産物そのものを大腸菌で生産させることが可能となった。これまでのプラスミドの構築工程について図 6 に示した。

【0068】

pET-papC1 を保持する大腸菌 BL21 (DE3) 株を、100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 液体培地 (1 % バクトトリプトン、0.5 % 酵母エキス、0.5 % 塩化ナトリウム) 中、37℃ で一晚培養した。得られた培養液 1 ml を 100 ml の同培地にシードし、37℃、2 時間培養した後、1 ml の 100 mM イソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を添加し、さらに 37℃ で 5 時間培養した。培養後、遠心により菌体を集め、4 ml

の細胞破碎用緩衝液 (50 mM トリシュー塩酸 (pH 8.0)、5 mM EDTA、10 %グリセロール) に懸濁した後、超音波処理により細胞を破碎した。破碎後、遠心により上清を得、これを細胞抽出液とした。また、プラスミドpET-11cを保持する大腸菌BL21(DE3)株についても同様の処理を行い、細胞抽出液を調製した。

【0069】

この様にして調製した細胞抽出液を用いて酵素活性を測定した。すなわち、本細胞抽出液を40 μ l、実施例3に記載のpTrc-papBを保持する大腸菌から調製し且つ煮沸処理を施した細胞抽出液を10 μ l、蒸留水を190 μ l、10 mM NAD溶液を10 μ l、基質溶液 (2 mg/ml 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM MOPS (和光純薬)、pH 7.5) を250 μ l混合し、30℃、1時間反応させた。反応終了後、反応液の一部を全自動アミノ酸分析機JLC-500/V (日本電子株式会社製) を用いて分析した。

【0070】

その結果、図7に示すように、pET-papC1を保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合には、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸のピークが減少し、さらにpapB遺伝子産物によって生じる4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸のピークも消失していた。p-アミノフェニルピルビン酸は全自動アミノ酸分析機JLC-500/Vにおいて検出されないため、その生成を直接確認することはできなかった。

【0071】

しかし、p-アミノフェニルアラニンのピークが検出され、これはpapC遺伝子産物によって生じたp-アミノフェニルピルビン酸が大腸菌のアミノトランスフェラーゼによりアミノ化されて生じたものと推定された。一方、煮沸処理を施した細胞抽出液及びpET-11cを保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合には、papB遺伝子産物によって生じた4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸のピークに変化はなかった。以上の結果からpapC遺伝子は4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードしていることが示された。

【0072】

実施例5 PF1022生産菌導入用プラスミドpPF260-A2及びpPF260-A3の構築

PF1022生産菌内で遺伝子を発現させるためのプラスミドpPF260-A2及びpPF260-A3は図8に示すようにして構築した。

【0073】

実施例2に記載のプラスミドpUC118-papAより約2 kbpのBclI DNA断片を調製した。これを、PF1022生産菌用発現ベクターpABPd（特願平11-252851号）のBamHI部位に挿入し、プラスミドpPF260-Aを得た。

【0074】

次に、pPF260-Aを制限酵素PstI及びBamHIで二重消化し、約1.7 kbpのDNA断片を調製した。これをpUC119のPstI及びBamHI部位にサブクローニングし、プラスミドpUC119-Aを得た。pUC119-Aを鋳型DNA、配列表の配列番号15に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、Muta-Gene in vitroミュータジェネシスキット（バイオラッド社製）を用いて部位特異的変異処理を施し、プラスミドpUC119-A1を得た。

【0075】

次に、pUC119-A1及びpPF260-Aを制限酵素PstI及びBamHIで二重消化し、約1.7 kbp及び約8.6 kbpのDNA断片を調製した後、これらを連結してプラスミドpPF260-A2を得た。さらに、pPF260-A2を制限酵素XbaIで消化した後、T4 DNAリガーゼで自己連結してプラスミドpPF260-A3を得た。

【0076】

実施例6 PF1022生産菌導入用プラスミドpPF260-B3の構築
PF1022生産菌内で遺伝子を発現させるためのプラスミドpPF260-B3は図9に示すようにして構築した。

【0077】

実施例3に記載のプラスミドpTrc-papBより約0.3 kbpのBamHI DNA断片を調製した。これを発現ベクターpABPdのBamHI部位に挿入し、プラスミドpPF260-Bを得た。pPF260-Bを制限酵素XbaIで消化した後、T4 DNAリガーゼで自己連結してプラスミドpPF260-B1を得た。

【0078】

次に、pPF260-B1を制限酵素PstIで消化し、約0.6 kbpのDNA断片を調製した。

これをpUC118のPstI部位に、papB遺伝子の向きがlacZ'遺伝子と同じ向きになるようにサブクローニングし、プラスミドpUC118-Bを得た。pUC118-Bを鋳型DNA、配列表の配列番号16に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、Muta-Gene in vitroミュータジェネシスキット（バイオラッド社製）を用いて部位特異的変異処理を施し、プラスミドpUC118-B1を得た。

【0079】

次に、pUC118-B1及びpPF260-B1を制限酵素PstIで消化し、約0.6 kbp及び約8.0 kbpのDNA断片をそれぞれ調製した後、これらを連結してプラスミドpPF260-B3を得た。

【0080】

実施例7 PF1022生産菌導入用プラスミドpPF260-C3の構築

PF1022生産菌内でpapC遺伝子を発現させるためのプラスミドpPF260-C3は図10に示すようにして構築した。

【0081】

実施例4に記載のプラスミドpET-papCより約1 kbpのBamHI DNA断片を調製した。これを発現ベクターpABPdのBamHI部位に挿入し、プラスミドpPF260-Cを得た。pPF260-Cを制限酵素XbaIで消化した後、T4 DNAリガーゼで自己連結してプラスミドpPF260-C1を得た。

【0082】

次に、pPF260-C1を制限酵素PstI及びSphIで二重消化し、約1.7 kbpのDNA断片を調製した。これをpUC118のPstI及びSphI部位にサブクローニングし、プラスミドpUC118-Cを得た。pUC118-Cを鋳型DNA、配列表の配列番号17に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、Muta-Gene in vitroミュータジェネシスキット（バイオラッド社製）を用いて部位特異的変異処理を施し、プラスミドpUC118-C1を得た。

【0083】

次に、pUC118-C1及びpPF260-C1を制限酵素PstI及びSphIで二重消化し、約1.7 kbp及び約7.6 kbpのDNA断片をそれぞれ調製した後、これらをT4 DNAリガーゼで連結してプラスミドpPF260-C3を得た。

【0084】

実施例8 PF1022生産菌の形質転換

pPF260-A2、pPF260-A3、pPF260-B3及びpPF260-C3をそれぞれ1 μ g、3 μ g、3 μ g及び3 μ gとなるように混合し、エタノールで沈殿させた後、10 μ lのTE緩衝液（10 mM トリスー塩酸（pH 8.0）、1 mM EDTA）に再溶解した。このようにして調製したDNA溶液を用いて、W097/00944号に記載の方法でPF1022生産菌を形質転換した。

【0085】

得られた形質転換体より染色体DNAを調製し、これらを鋳型DNAとし、サイクル数を25サイクルとした以外は実施例2～実施例4に記載の条件でPCRを行い、papA、papB及びpapC遺伝子の検出を行った。その結果、3種全ての遺伝子が導入された形質転換体として55-65株を選抜した。

【0086】

尚、形質転換体であるマイセリア・ステリリア（Mycelia Sterilia）55-65株は、FERM P-17568の受託番号のもと工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0087】

実施例9 PF1022生産菌形質転換体の培養とPF1022誘導体の検出

実施例8において選抜した形質転換体55-65株及び親株をW097/20945号に記載されている条件で培養した。培養終了後、40 ml分の培養液から遠心により菌体を集め、30 mlの酢酸エチルで抽出した。抽出液を濃縮乾固した後、2 mlのアセトニトリルに再溶解した。このうち10 μ lをHPLC分析に供した。

【0088】

HPLC分析の条件は、

HPLCシステム：株式会社 日立製作所 655A-11

カラム：Inertsil ODS-2 4.6 X 250 mm

移動相：アセトニトリル：水=70：30

流速：1.0 ml/min

カラム温度：40℃

検出器：日本分光工業株式会社870-UV

UV波長：245 nm

とした。

【0089】

図11に示したように、形質転換体55-65株には、PF1022-268(W097/11064号実施例1、Cyclo [MeLeu-Lac-MeLeu-(O₂N)PhLac-MeLeu-Lac-MeLeu-PhLac])及びPF1022-269(W097/11064号実施例2、Cyclo [MeLeu-Lac-MeLeu-(H₂N)PhLac-MeLeu-Lac-MeLeu-PhLac])と保持時間が一致するピークが検出された。一方、これらのピークは親株には検出されなかった。また、形質転換体由来の抽出液と各標準品を混合した後にHPLC分析を行った実験において、これらのピークが標準品のピークと完全に重なることが示された。さらに、これらのピークに含まれる物質について、LC-MS (四重極型ベンチトップLC/MSシステムNAVIGATOR with aQaTM (サーモクエスト株式会社製)) を用いて質量スペクトルを測定した結果、標準品のものと一致した。

【0090】

以上の結果から、papA、papB及びpapC遺伝子の3種が全て導入された形質転換体55-65株が、ベンゼン環のパラ位がニトロ基若しくはアミノ基で修飾されたPF1022誘導体を生産することが明らかとなった。

【0091】

【発明の効果】

本発明により、ベンゼン環を含んでいるが、そのベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基によって修飾されていない2次代謝産物を生産する生物において、コリスミ酸から

u

-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子が導入された形質転換体を利用する事により、窒素原子を含む官能基でベンゼン環のパラ位が特異的に修飾された2次代謝産物を製造することができる。

【0092】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Seika Kaisha, Ltd.

<120> Transformants and the method for production of
secondary metabolites using the said transformants

<130> PM1541

<140>

<141>

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 686

<212> PRT

<213> *Streptomyces venezuelae*

<400> 1

Met Arg Thr Leu Leu Ile Asp Asn Tyr Asp Ser Phe Thr His Asn Leu

1

5

10

15

Phe Gln Tyr Ile Gly Glu Ala Thr Gly Gln Pro Pro Val Val Val Pro

20

25

30

Asn Asp Ala Asp Trp Ser Arg Leu Pro Val Glu Asp Phe Asp Ala Ile

35

40

45

Val Val Ser Pro Gly Pr Gly Ser Pro Asp Arg Glu Arg Asp Phe Gly
50 55 60

Ile Ser Arg Arg Ala Ile Thr Asp Ser Gly Leu Pro Val Leu Gly Val
65 70 75 80

Cys Leu Gly His Gln Gly Ile Ala Gln Leu Phe Gly Gly Thr Val Gly
85 90 95

Leu Ala Pro Glu Pro Met His Gly Arg Val Ser Glu Val Arg His Thr
100 105 110

Gly Glu Asp Val Phe Arg Gly Leu Pro Ser Pro Phe Thr Ala Val Arg
115 120 125

Tyr His Ser Leu Ala Ala Thr Asp Leu Pro Asp Glu Leu Glu Pro Leu
130 135 140

Ala Trp Ser Asp Asp Gly Val Val Met Gly Leu Arg His Arg Glu Lys
145 150 155 160

Pro Leu Trp Gly Val Gln Phe His Pro Glu Ser Ile Gly Ser Asp Phe
165 170 175

Gly Arg Glu Ile Met Ala Asn Phe Arg Asp Leu Ala Leu Ala His His
180 185 190

Arg Ala Arg Arg His Gly Ala Asp Ser Pro Tyr Glu Leu His Val Arg
195 200 205

Arg Val Asp Val Leu Pr Asp Ala Glu Glu Val Arg Arg Gly Cys Leu
210 215 220

Pro Gly Glu Gly Thr Thr Phe Trp Leu Asp Ser Ser Ser Val Leu Glu
225 230 235 240

Gly Ala Ser Arg Phe Ser Phe Leu Gly Asp Asp Arg Gly Pro Leu Ala
245 250 255

Glu Tyr Leu Thr Tyr Arg Val Ala Asp Gly Val Val Ser Val Arg Gly
260 265 270

Ser Asp Gly Thr Thr Thr Arg Thr Arg Arg Pro Phe Phe Asn Tyr Leu
275 280 285

Glu Glu Gln Leu Glu Arg Arg Arg Val Pro Val Ala Pro Glu Leu Pro
290 295 300

Phe Glu Phe Asn Leu Gly Tyr Val Gly Tyr Leu Gly Tyr Glu Leu Lys
305 310 315 320

Ala Glu Thr Thr Gly Asp Pro Ala His Arg Ser Pro His Pro Asp Ala
325 330 335

Ala Phe Leu Phe Ala Asp Arg Ala Ile Ala Leu Asp His Gln Glu Gly
340 345 350

Cys Cys Tyr Leu Leu Ala Leu Asp Arg Arg Gly His Asp Asp Gly Ala

355

360

365

Arg Ala Trp Leu Arg Glu Thr Ala Glu Thr Leu Thr Gly Leu Ala Val

370

375

380

Arg Ala Pro Ala Glu Pro Thr Pro Ala Met Val Phe Gly Ile Pro Glu

385

390

395

400

Ala Ala Ala Gly Phe Gly Pro Leu Ala Arg Ala Arg His Asp Lys Asp

405

410

415

Ala Tyr Leu Lys Arg Ile Asp Glu Cys Leu Lys Glu Ile Arg Asn Gly

420

425

430

Glu Ser Tyr Glu Ile Cys Leu Thr Asn Met Val Thr Ala Pro Thr Glu

435

440

445

Ala Thr Ala Leu Pro Leu Tyr Ser Ala Leu Arg Ala Ile Ser Pro Val

450

455

460

Pro Tyr Gly Ala Leu Leu Glu Phe Pro Glu Leu Ser Val Leu Ser Ala

465

470

475

480

Ser Pro Glu Arg Phe Leu Thr Ile Gly Ala Asp Gly Gly Val Glu Ser

485

490

495

Lys Pro Ile Lys Gly Thr Arg Pro Arg Gly Gly Thr Ala Glu Glu Asp

500

505

510

Glu Arg Leu Arg Ala Asp Leu Ala Gly Arg Glu Lys Asp Arg Ala Glu

515

520

525

Asn Leu Met Ile Val Asp Leu Val Arg Asn Asp Leu Asn Ser Val Cys

530

535

540

Ala Ile Gly Ser Val His Val Pro Arg Leu Phe Glu Val Glu Thr Tyr

545

550

555

560

Ala Pro Val His Gln Leu Val Ser Thr Ile Arg Gly Arg Leu Arg Pro

565

570

575

Gly Thr Ser Thr Ala Ala Cys Val Arg Ala Ala Phe Pro Gly Gly Ser

580

585

590

Met Thr Gly Ala Pro Lys Lys Arg Thr Met Glu Ile Ile Asp Arg Leu

595

600

605

Glu Glu Gly Pro Arg Gly Val Tyr Ser Gly Ala Leu Gly Trp Phe Ala

610

615

620

Leu Ser Gly Ala Ala Asp Leu Ser Ile Val Ile Arg Thr Ile Val Leu

625

630

635

640

Ala Asp Gly Gln Ala Glu Phe Gly Val Gly Gly Ala Ile Val Ser Leu

645

650

655

Ser Asp Gln Glu Glu Glu Phe Thr Glu Thr Val Val Lys Ala Arg Ala

660

665

670

Met Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Ala Val Ala Gly Ala Arg

675

680

685

<210> 2

<211> 2061

<212> DNA

<213> *Streptomyces venezuelae*

<400> 2

atgcgcacgc ttctgatcga caactacgac tcgttcaccc acaacctgtt ccagtacatc 60
ggcgaggcca ccgggcaacc ccccgtcgtc gtgccaacg acgccgactg gtcgcggctg 120
cccgtcgagg acttcgacgc gatcgtcgtg tccccgggcc ccggcagccc cgaccgggaa 180
cgggacttcg gaatcagccg ccgggcgatc accgacagcg gcctgcccgt cctcggcgtc 240
tgcctcggcc accaggcat cgcccagctc ttcggcgga cgtcggcct cgccccgaa 300
cccatgcacg gccgggtctc cgaggtgcgg cacaccggcg aggacgtctt ccggggcctc 360
ccctcgccgt tcaccgccgt gcgtaccac tccctggccg ccaccgacct ccccgacgag 420
ctcgaacccc tcgcctggag cgacgacggg gtcgtcatgg gcctgcggca ccgcgagaag 480
ccgctgtggg gcgtccagtt ccaccggag tccatcgga gcgacttcgg ccgggagatc 540
atggccaact tccgcgacct cgccctcgcc caccaccggg cacggcgcca cggggccgac 600
tccccgtacg aactccacgt gcgccgctc gacgtgctgc cggacgccga agaggtacgc 660
cgcggtgcc tgcccggcga gggcaccacg ttctggctgg acagcagctc cgtcctcgaa 720
ggcgccctgc gcttctcctt cctcggcgac gaccgggcc cgctcgccga gtacctcacc 780
taccgcgtcg ccgacggcgt cgtctccgtc cgcggctccg acggcaccac gaccggacg 840
cggcgcccct tcttcaacta cctggaggag cagctcgaac gccgacgggt ccccgtcgcc 900
cccgaactgc ctttcgagtt caacctcggc tacgtcggct acctcggcta cgagctgaag 960
gcggagacca ccggcgaccc cgcgcaccgg tccccgcacc ccgacgccgc gttcctcttc 1020
gccgaccgcg ccatcgccct cgaccaccag gaaggctgct gctacctgct ggccctcgac 1080

cgccggggcc acgacgacgg cgcccgcgcc tggctgcggg agacggccga gaccctcacc 1140
ggcctggccg tccgcgcccc ggccgagccg acccccgcca tggcttccgg gatccccgag 1200
ggggcgggccg gcttcggccc cctggcccgc gcgcgccacg acaaggacgc ctacctcaag 1260
cgcatcgacg agtgcctcaa ggagatccgc aacggcgagt cgtacgagat ctgcctgacc 1320
aacatggtca ccgcgccgac cgaggcgacg gccctgccgc tctactccgc gctgcgcgcc 1380
atcagccccg tcccgtacgg cgccctgctc gagttccccg aactgtcggg gctgagcgcc 1440
tcgcccagagc ggttcctcac gatcggcgcc gacggcgggc tcgagtcaa gcccatcaag 1500
gggacccgcc cccggggcgg caccgcggag gaggacgagc ggctccgcgc cgacctggcc 1560
ggccggggaga aggaccgggc cgagaacctg atgatcgteg acctggtccg caacgacctc 1620
aacagcgtct gcgcgatcgg ctccgtccac gtgccccggc tcttcgaggt ggagacctac 1680
gcgcccgtgc accagctggt gtcgaccatc cggggacggc tgcggcccgg caccagcacc 1740
gccgcctgcg tacgcgccgc ctccccggc ggctccatga ccggcgcgcc caagaagcgc 1800
accatggaga tcatcgaccg cctggaggaa ggccccggg gcgtctactc cggggcgctc 1860
ggatggttcg cccctcagcgg cgccgccgac ctacgcatcg tcatccgcac catcgtgctg 1920
gccgacggcc aggcgagatt cggcgtcggc ggggcgatcg tgtccctctc cgaccaggag 1980
gaggagtcca ccgagaccgt ggtaaaggcc cgcgccatgg tcaccgccct cgacggcagc 2040
gccgtggcgg gcgcccgatg a 2061

<210> 3

<211> 103

<212> PRT

<213> Streptomyces venezuelae

<400> 3

Met Thr Glu Gln Asn Glu Leu Gln Arg Leu Arg Ala Glu Leu Asp Ala

1

5

10

15

Leu Asp Gly Thr Leu Leu Asp Thr Val Arg Arg Arg Ile Asp Leu Gly

20

25

30

Val Arg Ile Ala Arg Tyr Lys Ser Arg His Gly Val Pro Met Met Gln
35 40 45

Pro Gly Arg Val Ser Leu Val Lys Asp Arg Ala Ala Arg Tyr Ala Ala
50 55 60

Asp His Gly Leu Asp Glu Ser Phe Leu Val Asn Leu Tyr Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Thr Glu Met Cys Arg Val Glu Asp Leu Val Met Ser Arg Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ala Glu Asp Arg Arg
100

<210> 4

<211> 312

<212> DNA

<213> *Streptomyces venezuelae*

<400> 4

atgaccgagc agaacgagct gcagcggctg cgcgcggagc tcgacgccct cgacgggacg 60
ctcctggaca cgggtgcggcg ccgcatcgac ctcggtgtcc gcatcgcgcg gtacaagtcc 120
cggcacggcg tcccgatgat gcagcccggc cgggtcagcc tggtaagga cagggccgcc 180
cgctacgccg ccgaccacgg cctcgacgaa tcgttcctgg tgaacctcta cgacgtgac 240
atcacggaga tgtgcccgct cgaggacctg gtgatgagcc gggagagcct gacggccgag 300
gaccggcggt ga 312

<210> 5

<211> 322

<212> PRT

<213> *Streptomyces venezuelae*

<400> 5

Met Ser Gly Phe Pro Arg Ser Val Val Val Gly Gly Ser Gly Ala Val
1 5 10 15

Gly Gly Met Phe Ala Gly Leu Leu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Thr Leu
20 25 30

Val Val Asp Leu Val Pro Pro Pro Gly Arg Pro Asp Ala Cys Leu Val
35 40 45

Gly Asp Val Thr Ala Pro Gly Pro Glu Leu Ala Ala Ala Leu Arg Asp
50 55 60

Ala Asp Leu Val Leu Leu Ala Val His Glu Asp Val Ala Leu Lys Ala
65 70 75 80

Val Ala Pro Val Thr Arg Leu Met Arg Pro Gly Ala Leu Leu Ala Asp
85 90 95

Thr Leu Ser Val Arg Thr Gly Met Ala Ala Glu Leu Ala Ala His Ala
100 105 110

Pr Gly Val Gln His Val Gly Leu Asn Pro Met Phe Ala Pro Ala Ala

115

120

125

Gly Met Thr Gly Arg Pro Val Ala Ala Val Val Thr Arg Asp Gly Pr

130

135

140

Gly Val Thr Ala Leu Leu Arg Leu Val Glu Gly Gly Gly Gly Arg Pro

145

150

155

160

Val Arg Leu Thr Ala Glu Glu His Asp Arg Thr Thr Ala Ala Thr Gln

165

170

175

Ala Leu Thr His Ala Val Leu Leu Ser Phe Gly Leu Ala Leu Ala Arg

180

185

190

Leu Gly Val Asp Val Arg Ala Leu Ala Ala Thr Ala Pro Pro Pro His

195

200

205

Gln Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Arg Val Leu Gly Gly Ser Pro Glu

210

215

220

Val Tyr Gly Asp Ile Gln Arg Ser Asn Pro Arg Ala Ala Ser Ala Arg

225

230

235

240

Arg Ala Leu Ala Glu Ala Leu Arg Ser Phe Ala Ala Leu Val Gly Asp

245

250

255

Asp Pro Asp Arg Ala Asp Ala Pro Gly Arg Ala Asp Ala Pro Gly His

260

265

270

Pro Gly Gly Cys Asp Gly Ala Gly Asn Leu Asp Gly Val Phe Gly Glu

275

280

285

Leu Arg Arg Leu Met Gly Pro Glu Leu Ala Ala Gly Gln Asp His Cys

290

295

300

Gln Glu Leu Phe Arg Thr Leu His Arg Thr Asp Asp Glu Gly Glu Lys

305

310

315

320

Asp Arg

<210> 6

<211> 969

<212> DNA

<213> *Streptomyces venezuelae*

<400> 6

atgagcggct tccccgcag cgtcgtcgtc ggcggcagcg gggcgggtggg cggcatgttc 60
gccgggctgc tgcgggaggc gggcagccgc acgctcgtcg tcgacctcgt accgccgccg 120
ggacggccgg acgcctgcct ggtgggcgac gtcaccgcgc cggggcccga actcgcggcc 180
gccctccggg acgcggacct cgtcctgctc gccgtacacg aggacgtggc cctcaaggcc 240
gtggcgcccc tgacctggct catgcggccg ggcgcgctgc tcgccgacac cctgtccgtc 300
cggacgggca tggccgcgga gctcgcggcc cacgcccccg gcgtccagca cgtgggcctc 360
aaccgatgt tcgccccgc cgccggcatg accggccgac ccgtggccgc cgtggtcacc 420
agggacgggc cgggcgtcac ggccctgctg cggctcgtcg agggcggcgg cggcaggccc 480
gtacggctca cggcggagga gcacgaccgg acgacggcgg ccaccagga cctgacgcac 540
gccgtgctcc tctccttcgg gctcgccctc gccgcctcg gcgtcgacgt ccgggccctg 600

gcggcgacgg caccgccgcc ccaccaggtg ctgctcgccc tcctggcccg tgtgctcggc 660
ggcagccccg aggtgtacgg ggacatccag cggccaacc cccgggcggc gtccgcgcgc 720
cgggcgctcg ccgaggccct gcgctccttc gccgcgctgg tcggcgacga cccggaccgt 780
gccgacgccc ccgggcgcgc cgacgcccc ggccatcccg ggggatgcga cggcgccggg 840
aacctcgacg gcgtcttcgg ggaactccgc cggctcatgg gaccggagct cgcggcgggc 900
caggaccact gccaggagct gttccgcacc ctccaccgca ccgacgacga aggcgagaag 960
gaccgatga
969

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
DNA, a PCR primer for the pabAB gene

<400> 7

ggggggatcc tatgcgcacg cttctgatcg ac

32

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
DNA, a PCR primer for the pabAB gene

<400> 8

ggggggatcc tcatcgggcg cccgccactg cg

32

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

DNA, a PCR primer for the papA gene

<400> 9

ggtgatcata tgcgcacgct tctgatcgac

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

DNA, a PCR primer for the papA gene

<400> 10

ggtgatcatc atcgggcgcc cgccactgcg

30

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
DNA, a PCR primer for the papB gene

<400> 11

gcggatccat atgaccgagc agaacgagct g

31

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
DNA, a PCR primer for the papB gene

<400> 12

gcggatcctc accgccggtc ctcggc

26

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Descripti n of Artificial Sequence:synthesized

DNA, a PCR primer for the papC gene

<400> 13

gcggatccat atgagcggct tccccgca

29

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

DNA, a PCR primer for the papC gene

<400> 14

gcggatcctc atcggtcctt ctcgccttc

29

<210> 15

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

DNA, a primer for site-directed mutagenesis

<400> 15

gatcagaagc gtgcgcattg ttaggttgat tgatgggttt tgggaattg

49

<210> 16

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
DNA, a primer for site-directed mutagenesis

<400> 16

ctcgttctgc tcggtcattg ttaggttgat tgatgggttt tgggaattg

49

<210> 17

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
DNA, a primer for site-directed mutagenesis

<400> 17

cgggggaagc cgctcattgt taggttgatt gatgggtttt gggaattg

48

【図面の簡単な説明】

【図1】

第1図に、ストレプトミセス・ヴェネズエラ (Streptomyces venezuelae) から

単離したDNA断片の制限酵素地図及びオープンリーディングフレームの位置を示す。

【図2】

第2図に、プラスミドpTrc-papAの作製法を示す。

【図3】

第3図に、papA遺伝子産物の酵素活性検出に用いたアミノ酸分析機のクロマトグラムを示す。

【図4】

第4図に、プラスミドpTrc-papBの作製法を示す。

【図5】

第5図に、papB遺伝子産物の酵素活性検出に用いたアミノ酸分析機のクロマトグラムを示す。

【図6】

第6図に、プラスミドpET-papC1の作製法を示す。

【図7】

第7図に、papC遺伝子産物の酵素活性検出に用いたアミノ酸分析機のクロマトグラムを示す。

【図8】

第8図に、プラスミドpPF260-A2及びpPF260-A3の作製法を示す。

【図9】

第9図に、プラスミドpPF260-B3の作製法を示す。

【図10】

第10図に、プラスミドpPF260-C3の作製法を示す。

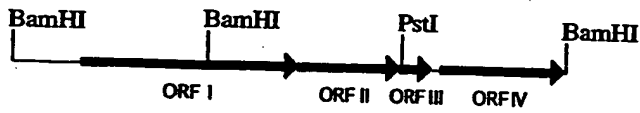
【図11】

第11図に、ベンゼン環のパラ位がニトロ基若しくはアミノ基で修飾されたPF1022誘導体の検出に用いたHPLCのクロマトグラムを示す。

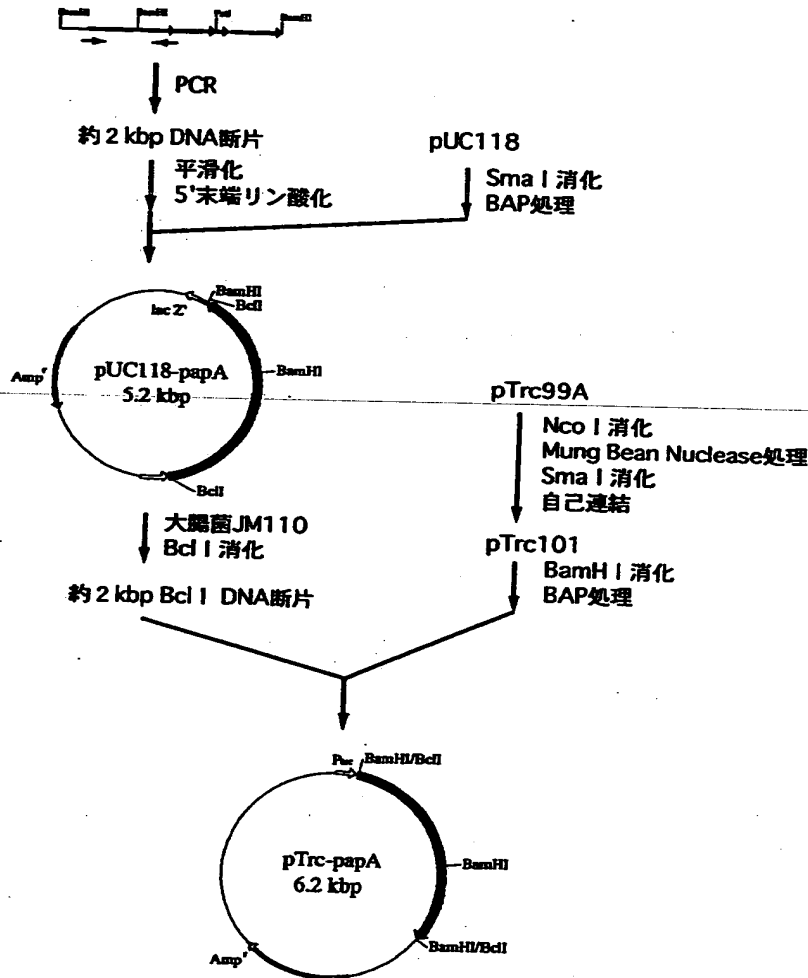
【書類名】

図面

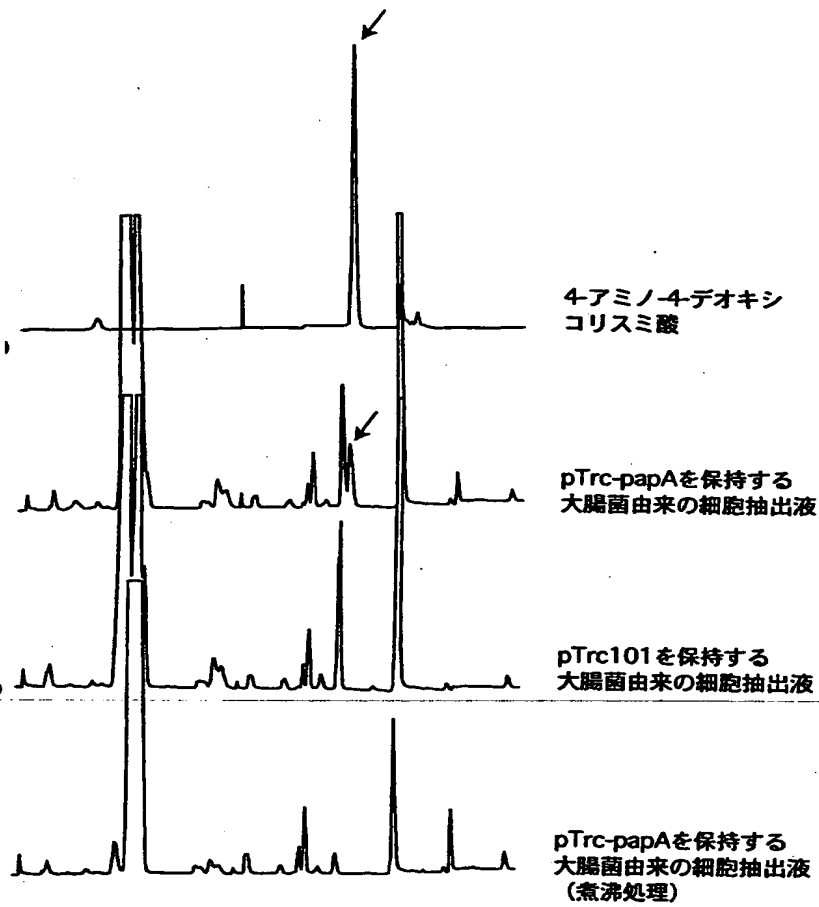
【図 1】



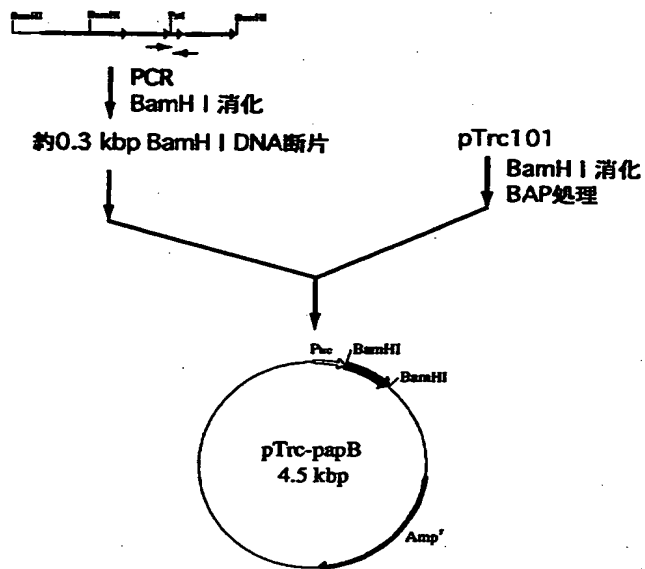
【図 2】



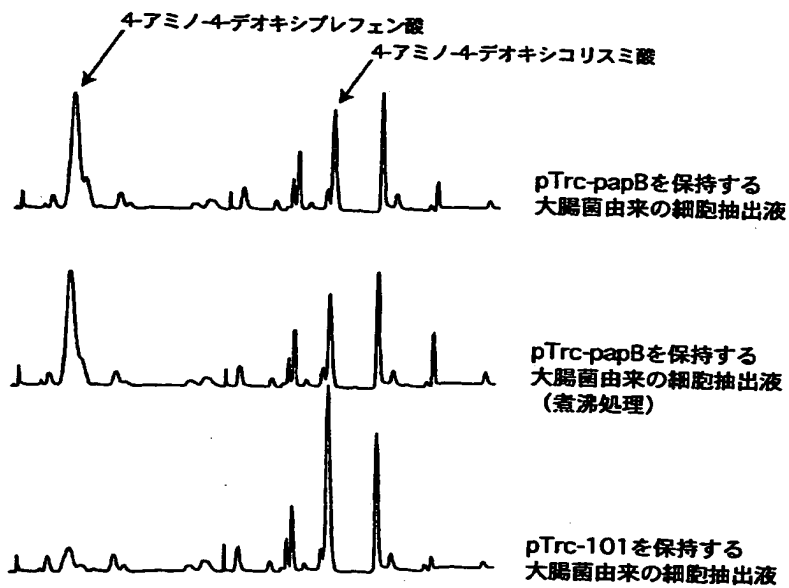
【図 3】



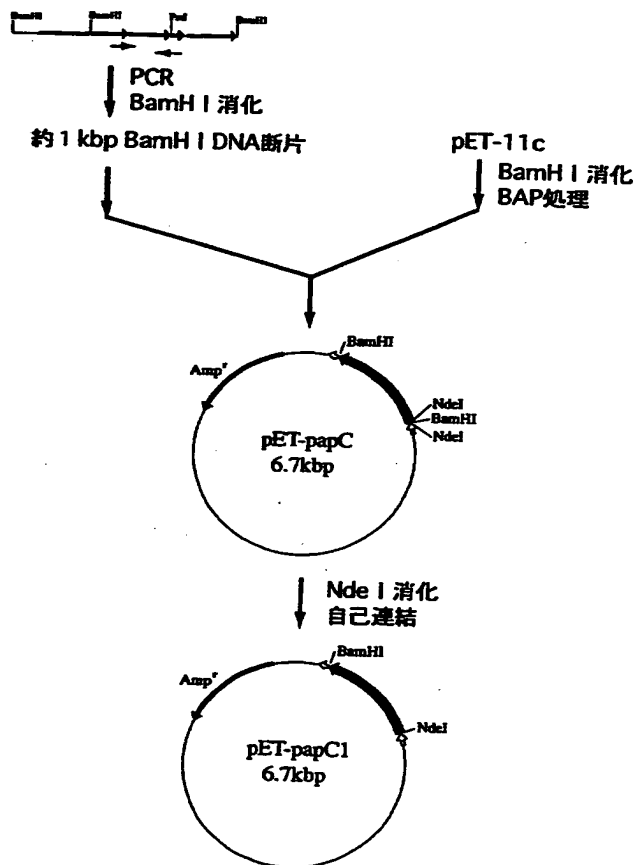
【図 4】



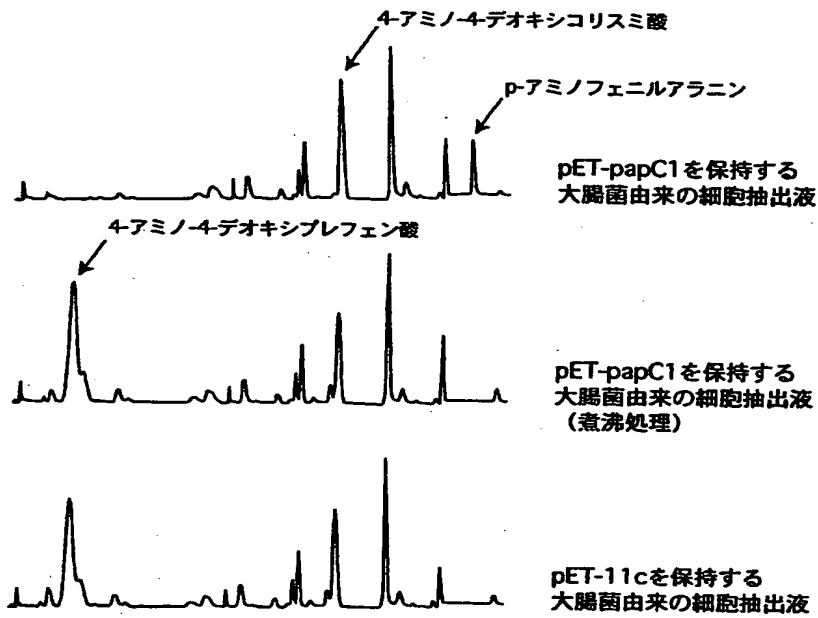
【図 5】



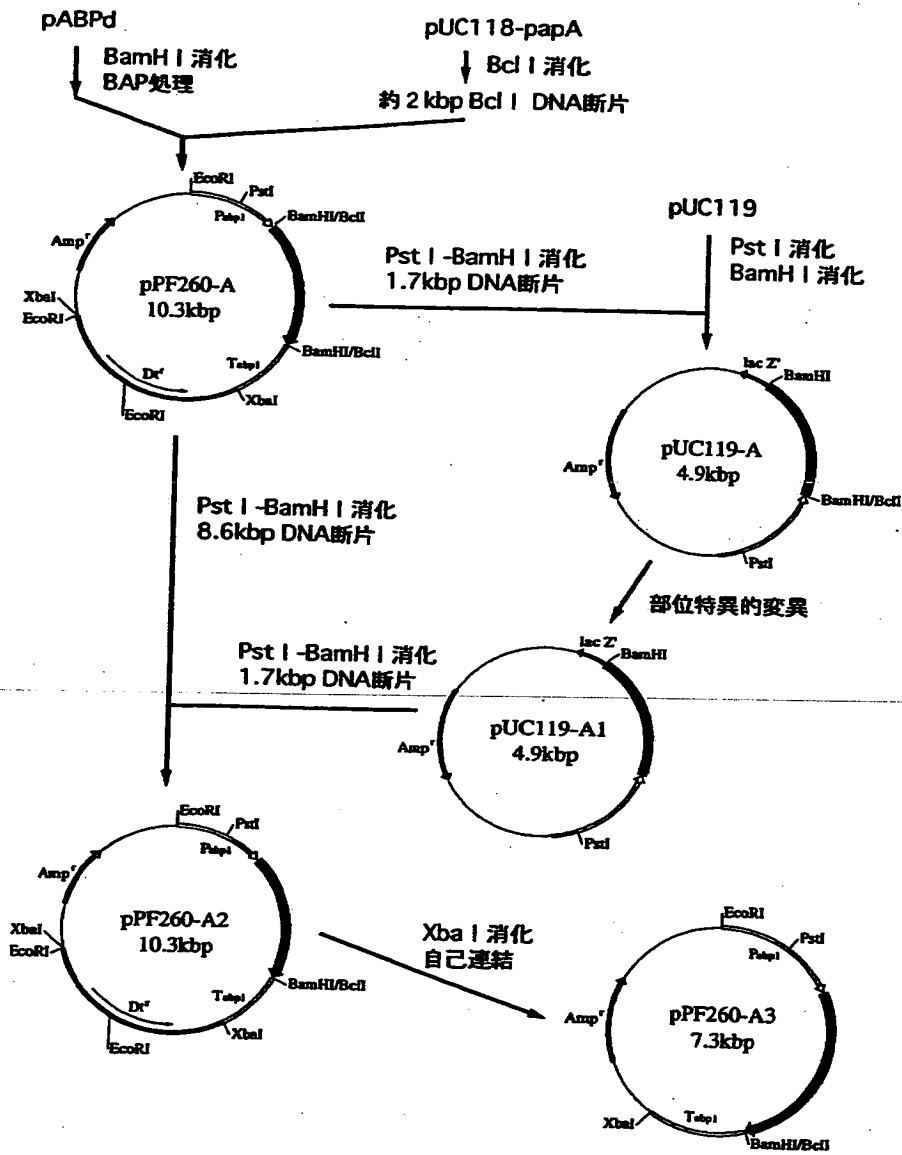
【図 6】



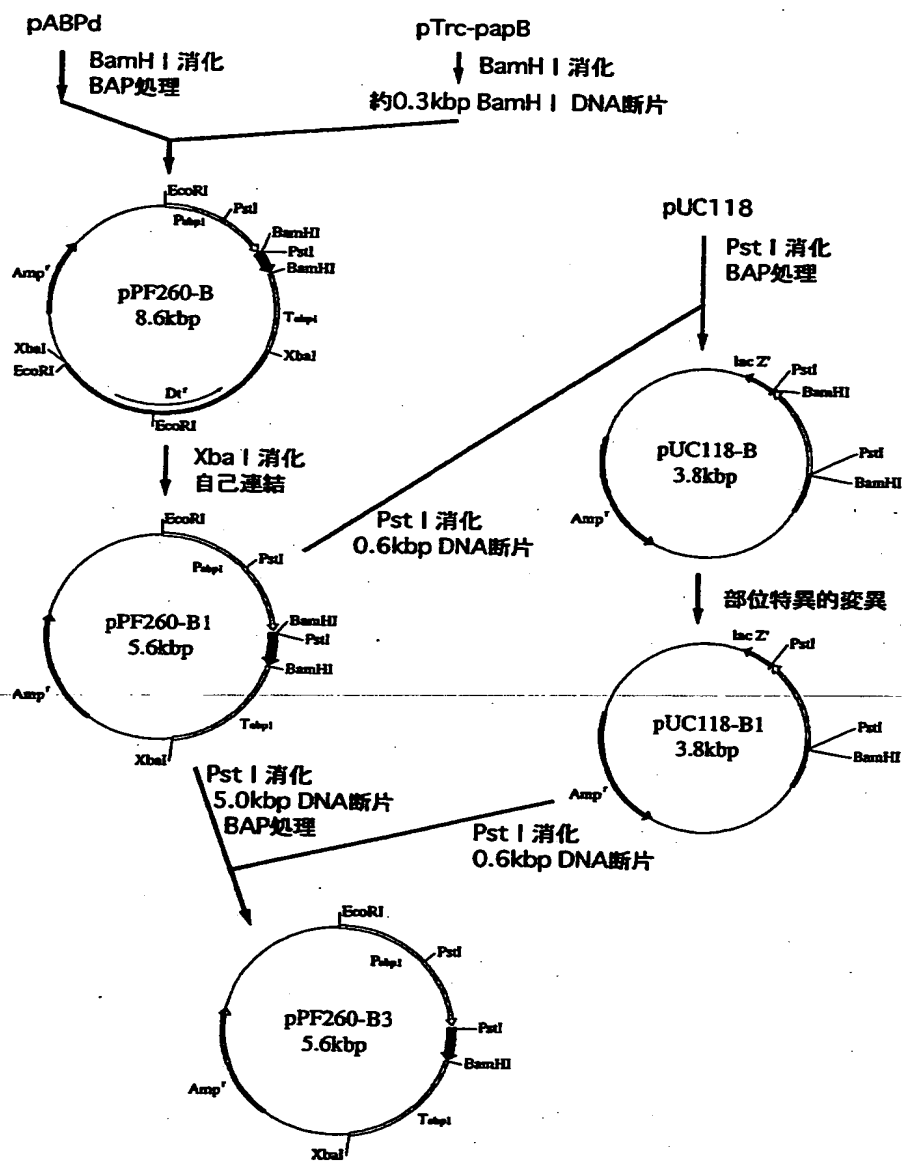
【図 7】



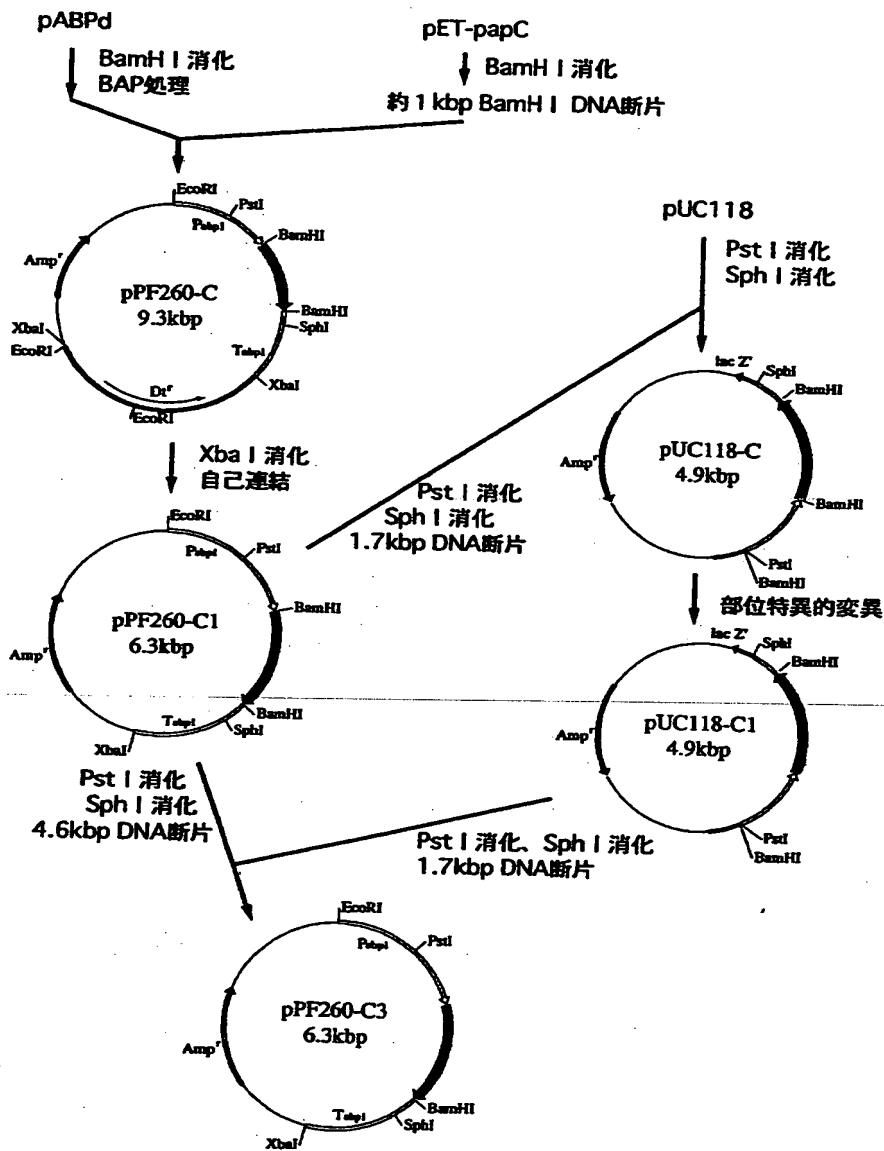
【图 8】



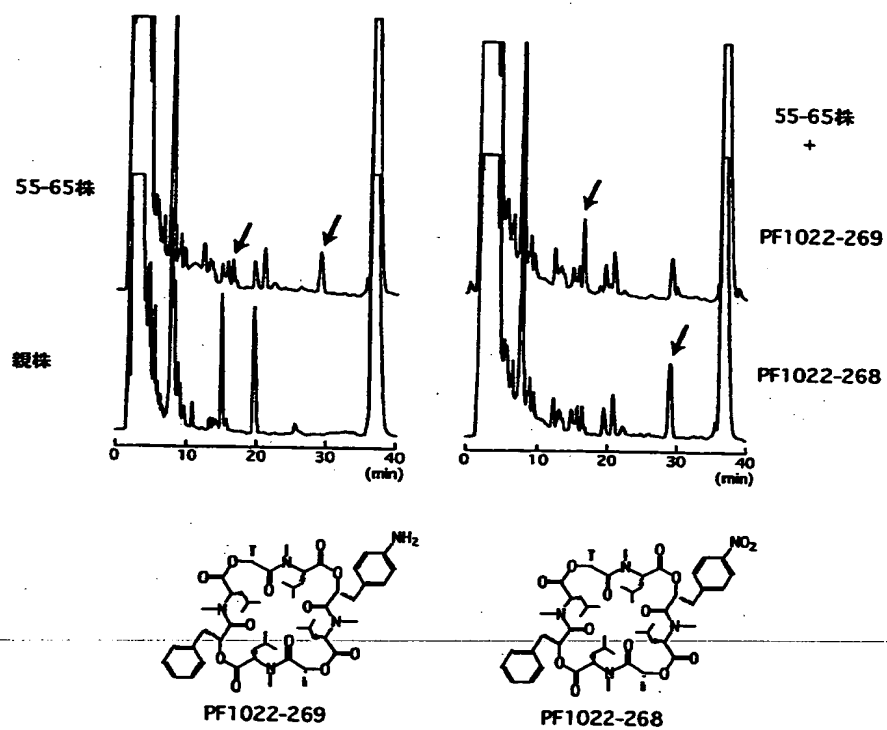
【图 9】



【图 10】



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ベンゼン環骨格を含む2次代謝産物で、該2次代謝産物のベンゼン環のパラ位がニトロ基あるいはアミノ基により修飾された2次代謝産物を新たに生産できるように改変された形質転換体及び該形質転換体によるベンゼン環のパラ位がニトロ基あるいはアミノ基により修飾された2次代謝産物の製造法を提供すること。

【解決手段】

ベンゼン環骨格を含む2次代謝産物を生産する生物を、コリスミ酸から p-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子を含むDNAによって形質転換し、ベンゼン環のパラ位がニトロ基あるいはアミノ基により修飾された2次代謝産物を新たに生産するようになった形質転換体を取得した。

【選択図】 なし。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006091]

1. 変更年月日 1990年 8月 3日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都中央区京橋2丁目4番16号
氏 名 明治製菓株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)